



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월29일

(11) 등록번호 10-1477141

(24) 등록일자 2014년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/105 (2006.01) **C12N 9/50** (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0055800
 (22) 출원일자 2013년05월16일
 심사청구일자 2013년05월16일
 (65) 공개번호 10-2014-0135479
 (43) 공개일자 2014년11월26일
 (56) 선행기술조사문헌
 JP2003274879 A
 KR1020070091809 A
 JP2001333705 A
 메밀 알레르기 연구의 최근 동향: 총설(Food Engineering Progress, 제16권, 제4호, 제314-324면, 2012년 11월)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국식품연구원
 경기도 성남시 분당구 안양관교로1201번길 62 (백현동)
 (72) 발명자
도정룡
 경기 용인시 수지구 만현로 25, 107동 502호 (상현동, 만현마을롯데캐슬아파트)
손동화
 경기도 용인시 기흥구 어정로 62-28 지석마을 그대가크레던스106-1001호
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
양부현

전체 청구항 수 : 총 5 항

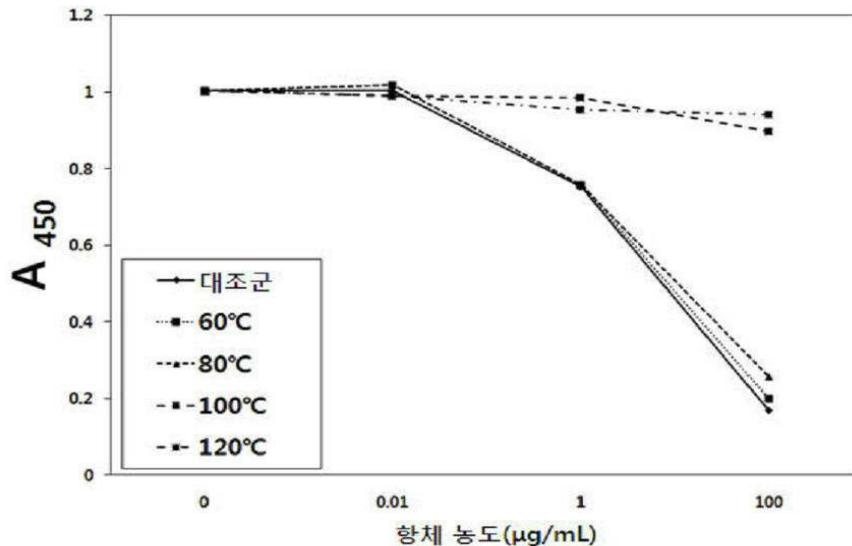
심사관 : 이형곤

(54) 발명의 명칭 **효소 처리 또는 열처리를 통한 메밀의 알레르기 항원성 저감 방법**

(57) 요약

본 발명은 알칼리아제, 알카라인 프로테아제, 브로멜라인, 파파인, 칼루폴린, 프로타맥스 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질 분해효소를 메밀과 접촉시키거나 메밀에 90-180℃의 열을 가하여 메밀의 알레르기 항원성을 저감시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 방법에 의하여 메밀 단백질 중 메밀 알레르기 항원성을 가지는 단백질을 전 범위를 제거할 수 있는 이점이 있다. 따라서 본 발명은 식품 알레르기 중의 하나인 메밀 알레르기 질환의 예방에 크게 기여할 수 있다.

대표도 - 도10



(72) 발명자

신희순

경기 안양시 만안구 안양천서로 245, 121동 105호
(안양동, 진흥아파트)

한영신

서울 강남구 역삼로 307, 203동 404호 (역삼동, 역삼아이파크)

오상석

서울 용산구 녹사평대로 168-12, (이태원동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 E0121504

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국식품연구원

연구사업명 한국식품연구원 주요사업

연구과제명 알레르겐의 저감화에 의한 저알레르기 식품의 개발연구

기 여 율 1/1

주관기관 한국식품연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

알칼라아제, 알카라인 프로테아제, 브로멜라인, 파파인, 칼루폴린, 프로타벡스 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질 분해효소를 메밀과 접촉시켜 메밀의 알레르기 항원성을 저감시키는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 처리는 메밀에 있는 10-250 kDa 단백질의 함량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 알카라인 프로테아제는 0.5-20 (w/w)%로 1-15시간 반응시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 상기 접촉 전 또는 접촉 후에 메밀의 이황화 결합(disulfide bonds)을 절단하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 저감화 전 메밀과 비교하여 알레르기 항원성이 10^1 - 10^{∞} 배 저감된 알레르기 저감화 메밀.

청구항 7

삭제

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 효소 처리 또는 열처리를 통하여 메밀의 알레르기 항원성을 저감시키는 방법 및 알레르기 항원성이 저감된 메밀에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

식품알레르기는 최근 10년간 선진국에서는 약 3-6%의 어린이들에게서 발병되며 증가하는 추세를 보이고 있다 (Sanders DS. Mucosal integrity and barrier function in the pathogenesis of early lesions in Crohn's disease. *J.Clin.Pathol.* 58:568572(2005)). 식품알레르기는 소화관을 통해 체내에 들어 온 식품에 대하여 발생하는 것으로 주로 제 I 형 과민반응에 해당한다. 알레르기 환자의 경우 장관을 통하여 식품알레르겐이 소화되지 않은 상태로 침투하게 되며(Gell PGH, Coombs RRA, eds. *Clinical Aspects of Immunology*. 1st ed. Oxford, England: Blackwell(1963); Tesaki S, et al., *An Active Compound against Allergen Absorption in*

Hypoallergenic Wheat Flour Produced by Enzymatic Modification. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66:1930-1935(2002)), 이러한 알레르겐의 장내 흡수가 식품알레르기 발증의 첫 단계라 할 수 있다(Isobe N, Suzuki M, Oda M, Tanabe S. Enzyme-Modified Cheese Exerts Inhibitory Effects on Allergen Permeation in Rats Suffering from Indomethacin-Induced Intestinal Inflammation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:1740-1745(2007)).

[0003] 식품알레르기의 원인 식품으로서, 계란, 돼지고기, 복숭아, 고등어, 닭고기, 우유, 메밀 및 계 등이 알려져 있다. 식품알레르기의 자인경과는 원인 식품의 철저한 회피로 증상의 호전을 기대할 수 있으나, 일부의 경우 회피가 힘들거나 회피하더라도 증상이 지속되는 경우도 있다.

[0004] 메밀은 식품알레르기의 대표적인 식품이다. 식품알레르기는 1-2년 시간이 지남에 따라 없어지는 경우가 대부분이지만 땅콩과 메밀 알레르기는 나이가 들어도 지속되는데 아직까지는 그이유가 밝혀지지 않고 있다(Nakamura S, et al., Studies on the Buckwheat allergose. Report 2 : On the cases with the Buckwheat Allergose. *Allergy and Immunology* 1974 / 1975 ; 20 / 21 : 457-465; Kobayashi S. Different aspects of Occupational Asthma in Japan. In : Frazier CA (ed.) *Occupational asthma*. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1980, pp. 229-256; Valdivieso R, et al., Occupational asthma and contact urticaria caused by buckwheat flour. *Ann Allergy* 1989 ; 63 : 149-152).

[0005] 따라서 메밀의 알레르기성을 감소시키는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 식품알레르기의 원인 식품으로서의 메밀의 알레르기 항원성을 효과적으로 감소시킬 수 있는 기술을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 메밀에 특정 단백질 분해효소 또는 일정 범위의 열을 처리하는 경우 알레르기 항원성을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 단백질 분해효소 처리 또는 열처리를 통하여 메밀의 알레르기 항원성을 감소시키는 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 알레르기 저감화 메밀을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 알칼라아제, 알카라인 프로테아제, 브로멜라인, 파파인, 칼루폴린, 프로타맥스 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질 분해효소를 메밀과 접촉시키거나 메밀에 80-200℃의 열을 가하여 메밀의 알레르기 항원성을 저감시키는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명자들은 식품알레르기의 원인 식품으로서의 메밀의 알레르기 항원성을 효과적으로 감소시킬 수 있는 기술을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 메밀에 특정 단백질 분해효소 또는 일정 범위의 열을 처리하는 경우 알레르기 항원성을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

[0013] 본 발명이 적용되는 메밀은 효소 처리 전에 가공되거나 가공되지 않은 것이다. 본 발명의 바람직한 구현예에

따르면, 본 발명의 메밀은 물에 함침되어 부풀림 공정 처리가 된 것이다.

- [0014] 본 명세서에서 사용하는 용어 “알카라인 프로테아제”는 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*)-유래 염기성 프로테아제를 의미한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 10-250 kDa 단백질의 함량을 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 10-100 kDa 또는 10-50 kDa 단백질의 함량을 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 30-50 kDa, 24 kDa, 19 kDa, 16 kDa 또는 10 kDa 단백질의 함량을 감소시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 24 kDa, 19 kDa, 16 kDa 및 10 kDa 단백질의 함량을 감소시킨다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 알카라인 프로테아제는 0.5-20 (w/w)% 농도로 1-15 시간 동안 접촉시킨다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 농도는 0.5-15 (w/w)%, 1-15 (w/w)%, 3-15 (w/w)%, 5-15 (w/w)%, 7-15 (w/w)% 또는 7-13 (w/w)% 이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 시간은 1-10 시간, 1-7 시간, 3-7 시간 또는 3-5 시간이다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 본 발명의 접촉 전 또는 접촉 후에 곡물의 이황화 결합(disulfide bonds)을 절단하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 열은 90-150°C, 100-150°C, 110-150°C 또는 110-130°C이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 열은 90-130°C 또는 100-130°C이다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 열은 1-180분 동안 가한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 열은 5-150분, 5-120분, 5-90분, 8-90분 또는 8-70분 동안 가한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 열은 10-180분, 10-120분, 10-90분 또는 10-70분 동안 가한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 열은 30-180분, 30-120분, 30-90분 또는 30-70분 동안 가한다.
- [0020] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 열은 90-110°C에서 5-120분, 8-120분, 10-120분, 30-120분, 30-90분, 50-90분 또는 50-70분 동안 가한다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 열은 110-200°C에서 1-120분, 5-120분, 5-90분, 8-90분 또는 8-70분 동안 가한다.
- [0021] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 저감화 전 메밀과 비교하여 알레르기 항원성이 10^1 - 10^{∞} 배 저감된 알레르기 저감화 메밀을 제공한다.
- [0022] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 처리에 의해 메밀에 있는 알레르겐이 저감화 전 메밀과 비교하여 10^1 - 10^{∞} 배 감소되어 알레르기 항원성을 효율적으로 저감시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 알레르기 저감화 메밀은 저감화 전 메밀과 비교하여 알레르기 항원성이 10^1 - 10^3 배, 10^1 - 10^2 배, 2×10^1 - 10^2 배, 3×10^1 - 10^2 배, 10^2 배 또는 40배 저감된 알레르기 저감화 메밀이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 알레르기 저감화 메밀은 저감화 전 메밀과 비교하여 알레르기 항원성이 10^2 - 10^3 배 또는 10^2 배 저감된 알레르기 저감화 메밀이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 알레르기 저감화 메밀은 저감화 전 메밀과 비교하여 알레르기 항원성이 10^2 - 10^{∞} 배, 10^3 - 10^{∞} 배 또는 10^4 - 10^{∞} 배 저감된 알레르기 저감화 메밀이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 알레르기 저감화 메밀은 저감화 전 메밀과 비교하여 알레르기 항원성이 10^2 - 10^{10} 배, 10^3 - 10^{10} 배 또는 10^4 - 10^{10} 배 저감된 알레르기 저감화 메밀이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 알레르기 저감화 메밀은 저감화 전 메밀과 비교하여 알레르기 항원성이 10^2 - 10^5 배, 10^3 - 10^5 배, 10^4 - 10^5 배, 10^3 배 또는 10^4 배 저감된 알레르기 저감화 메밀이다.
- [0024] 또한, 알레르기 항원성 저감 정도는 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, 메밀 알레르겐의 양의 변화는 면역염색, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 웨스턴 블롯팅, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed

Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

- [0025] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체가 본 발명의 마커 분자를 검출하는 데 이용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명은 (i) 분석하고자 하는 메틸 알레르겐을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서의 메틸 알레르겐에 대한 항체와 상기 메틸 알레르겐을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 추가적으로 포함한다.
- [0027] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다.
- [0028] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P₄₅₀을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), *o*-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/피로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)와 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 메틸 알레르겐에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 메틸 용해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, 메틸 알레르겐에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0030] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P₄₅₀), 방사능물질(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.
- [0031] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널의 검출은 본 발명의 타겟의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용하는 면역분석 방법은 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 방법이다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 ELISA 방법은 바람직하게는 쌀 알레르기 항원을 고체상에 코팅하는 단계; 1차 항체희석용액을 코팅된 고체상에 분주하는 단계; 표지된 2차 항체를 이용하여 발색하는 단계; 및 흡광도를 측정하는 단계를 포함하는 간접 ELISA(indirect ELISA)이다.
- [0033] 본 발명의 알레르기 저감화 메틸은 상술한 본 발명의 방법에 따라 제조된 것이기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0034] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 알레르기 저감화 메틸은 상술한 본 발명의 방법에 의해 저감화된 메틸이다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0036] (a) 본 발명은 알카라인 프로테아제 또는 90-180℃의 열을 가하여 메밀의 알레르기 항원성을 저감시키는 방법을 제공한다.
- [0037] (b) 본 발명은 저감화 전 메밀과 비교하여 알레르기 항원성이 10^1-10^{∞} 배 저감된 알레르기 저감화 메밀을 제공한다.
- [0038] (c) 본 발명에 따르면, 본 발명의 방법에 의하여 메밀 단백질 중 메밀 알레르기 항원성을 가지는 단백질을 전 범위를 제거할 수 있는 이점이 있다.
- [0039] (d) 본 발명은 식품 알레르기 중의 하나인 메밀 알레르기 질환의 예방에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 메밀 단백질 크기의 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.
- 도 2는 메밀 단백질과 메밀 알레르기 환자혈청의 반응성을 나타낸다.
- 도 3은 토끼에서 생산한 메밀 단백질에 대한 항혈청의 항체를 나타낸다.
- 도 4는 처리한 효소에 따른 메밀 알레르기 항원 단백질의 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.
- 도 5는 처리한 효소에 따른 메밀 알레르기 항원 단백질에 대한 토끼 혈청을 이용한 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸다.
- 도 6은 처리한 효소에 따른 메밀 단백질의 항원성 저감화 정도를 ciELISA(간접 경합 ELISA)에 의하여 나타낸 결과이다.
- 도 7은 열처리 온도에 따른 메밀 알레르기 항원 단백질의 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.
- 도 8은 열처리 온도에 따른 메밀 알레르기 항원 단백질에 대한 토끼 혈청을 이용한 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸다.
- 도 9는 열처리 온도에 따른 메밀 단백질의 항원성 저감화 정도를 간접 비경합 ELISA에 의하여 나타낸 결과이다.
- 도 10은 열처리 온도에 따른 메밀 단백질의 항원성 저감화 정도를 ciELISA에 의하여 나타낸 결과이다.
- 도 11은 열처리 온도 및 시간에 따른 메밀 알레르기 항원 단백질의 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.
- 도 12a-12b는 열처리 시간에 따른 메밀 알레르기 항원 단백질에 대한 토끼 혈청을 이용한 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸다. 도 12a는 100℃로 열처리한 경우의 결과이고, 도 12b는 120℃로 열처리한 경우의 결과를 나타낸다.
- 도 13a-13b는 열처리 시간에 따른 메밀 단백질의 항원성 저감화 정도를 간접 비경합 ELISA에 의하여 나타낸 결과이다. 도 13a는 100℃로 열처리한 경우의 결과이고, 도 13b는 120℃로 열처리한 경우의 결과를 나타낸다.
- 도 14a-14b는 열처리 시간에 따른 메밀 단백질의 항원성 저감화 정도를 ciELISA에 의하여 나타낸 결과이다. 도 14a는 100℃로 열처리한 경우의 결과이고, 도 14b는 120℃로 열처리한 경우의 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [0042] **실시예**

[0043] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 “% “는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0044] **재료 및 방법**

[0045] **메밀 단백질 추출 및 정량**

[0046] 메밀 단백질을 추출하기 위하여 메밀(*Fagopyrum esculentum*)을 가루로 만든 봉평농협(대한민국)의 메밀가루를 구입하여 사용하였다. 0.086 M NaCl과 0.033 M NaHCO₃를 증류수에 녹여 완충액을 만든 후, 완충액과 메밀가루를 10:1의 비율로 섞어 저온실에서 24시간 교반하여 단백질을 추출하였다. 이후 12,000 RPM에서 30분 동안 원심분리하여 상층액을 취해 3 kDa 울트라필터(Amicon Ultra社, 아일랜드)를 이용하여 3 kDa 이상의 분획을 취하였다. 시료는 -80℃에서 24시간 동안 동결건조 후 -70℃에서 보관하였다.

[0047] 단백질 정량은 Pierce BCA 단백질 분석 키트(Pierce Biotechnology社, 미국)를 이용하여 BCA 방법으로 측정하였다.

[0048] **메밀 단백질의 SDS-PAGE**

[0049] 추출한 메밀의 단백질 크기를 알아보기 위하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Gel은 12% 및 15% 세퍼레이팅 겔(separating gel)과 5% 스택킹 겔(stack gel)을 이용하였고, 시료는 20 /로 정량하고 샘플 버퍼(1 M Tris-HCl:pH 6.8, 50% 글리세롤, 10% SDS, 1% 브로모페놀 블루)를 첨가하여 100℃에서 5분 동안 가열한 뒤 사용하였다. 전기영동은 200 V에서 40분 동안 시행하였으며 전기영동 후, 겔은 쿠마시 염색 용액(1.0 g 쿠마시 블루 R-250, 450 mL MeOH, 450 mL H₂O, 100 mL 빙초산, 800 mL H₂O)로 30분 동안 염색하고 쿠마시 탈염색 용액(100 mL 메탄올, 100 mL 빙초산, 800 mL H₂O)로 탈색하였다. 그 결과 50 kDa 이상, 30-50 kDa, 24 kDa, 19 kDa, 16 kDa, 10 kDa의 단백질 밴드를 보였으며 이 중 24, 19, 16, 10 kDa 단백질은 메밀의 주요 알레르겐으로 알려져 있는 것이다(도 1).

[0050] **메밀 알레르기 환자 혈청의 확보**

[0051] 메밀 알레르기 환자의 혈청은 삼성서울병원에서 구입하였다. 쌀에 감작된 환자의 혈청을 확보하기 위해 특이 IgE 항체를 ImmunoCAP(Phadia, 스웨덴)를 이용하여 측정하여 0.36 kU/L 이상인 경우를 양성으로 간주하였다. 알레르기 질환은 아토피피부염, 두드러기, 천식, 알레르기비염 및 알레르기 위장관염 등으로 분류하여, 환자의 임상 증상, 가족력 및 식이섭취 상황 등 관련 정보를 데이터베이스 시스템에 구축하였다. 혈액은 원심 분리하여 혈청을 확보한 후 분석 시까지 -70℃에 보관 하였다. 환자의 혈청은 보관 장소, 샘플의 데이터 관리 및 장기 보관에 따른 혈청의 변성 방지 등과 같은 문제점들을 보완하기 위하여 VLS(vacuum like sealing)이라는 보관 방식을 이용하였다. 이들 중 메밀에 대한 특이 IgE 수치가 충분히 높은 혈청을 선택하여 혈청선별검사서 사용하였다.

[0052] 특이 IgE 항체 검사는 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 먼저 항원이 부착된 CAP(capsule allergen product)을 세척액으로 8번 세척하고, 이 CAP을 희석하지 않은 환자 혈청(50 μL)이 담겨져 있는 용기로 옮겨 실온에서 혈청과 30분 동안 반응시켰다. 반응을 마친 CAP은 다시 8번 세척하고 여기에 컨쥬게이트(효소-항-IgE 및 β-갈락토시다아제) 50 μL를 넣고 실온에서 150분 동안 반응시킨 후, 다시 8번 세척한 다음 반응용액(형광 기질 및 0.01% 4-메틸움벨리페릴-β-D-갈락토시드) 50 μL를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 이 과정이 끝나면 여기에 차단 용액(탄산 나트륨) 400 μL를 첨가하고 2분 동안 반응시킨 뒤 플루오로카운트 96을 이용하여 발색정도를 측정하였다. 여기에서 계측된 수치로 특이 IgE 농도를 구하기 위하여, 6가지 농도의 표준검사액(0.35, 0.7, 3.5, 17.5, 50 및 100 kU/L)으로 작성된 표준곡선을 이용하여 절대치를 계산하였다. 혈청은 희석하지 않고 검사하였고 측정 한계치는 0.35 U/mL 이상 및 100 U/mL 이하로서 0.35 U/mL 미만인 경우는 0 U/mL으로, 100 U/mL가 넘는 경우는 101 U/mL으로 결과를 처리하였다.

[0053] 표 1은 삼성서울병원에서 검사를 시행한 메밀 알레르기 환자의 검사결과이다. 혈청이 모집된 환자 수는 20명이였다. 성별 분포는 남자 16명, 여자 4명이었으며, 평균연령은 5.45±5.02세였다. 혈청 중 메밀에 대한 특이

IgE의 평균은 24.69±22.02 kU/L였다.

표 1

메밀 양성 환자 혈청 확보 현황

번호	나이(세)	성별	총 IgE (kU/L)	식품 특이 항체(kU/L)
1	3	여자	1249	10.5
2	4	남자	5001	57.6
3	16	여자	646	41
4	3	남자	2151	13
5	12	남자	558	58.2
6	1	남자	2036	33.0
7	7	남자	1518	16.4
8	2	남자	1582	51.7
9	4	여자	483	47.2
10	5	남자	190	1.11
11	19	남자	150	9.8
12	4	남자	902	2.47
13	6	남자	1632	1.58
14	3	남자	964	51.4
15	2	남자	5001	55
16	2	여자	3882	24.6
17	3	남자	1530	4.18
18	10	남자	1677	7.59
19	2	남자	656	1.95
20	1	남자	777	5.54

[0054]

[0055]

환자혈청을 이용한 메밀 알레르기 항원 규명

[0056]

메밀 단백질의 항원성을 조사하기 위해 웨스턴 블로팅(western blotting)을 실시하였다. SDS-PAGE를 실시한 후, 토우빈 전달(transfer) 완충액(TRIS-글라이신 완충액; 25 mM Tris, 192 mM 글라이신, 10% MeOH, 0.1% SDS)을 이용하여 단백질을 니트로셀룰로오스 막(Bio-Rad, 162-0115)으로 전달시켰다. 이 과정은 100 V, 4시간 동안 Mighty small transphor(Hoefer Pharmacia Biotech Inc., 80-6204-26)내에서 진행하였다. 전달 후, 막을 블로킹 용액(blocking solution)(BSA 1%/Tris-buffered saline with Tween 20, TBST; 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 넣어 하룻밤 동안 상온에서 정치하였다. 1차 항체를 토끼 항특이항체로 사용한 경우는 1:10,000으로, 항특이항체로 사용한 경우는 1:7,500으로 희석하였다. 희석한 1차 항체는 1시간 동안 상온에서 membrane과 반응시키고 TBST를 이용하여 15분씩 세 번 세척하였다. 2차 항체(염소 항-토끼 IgG-AP 콘쥬게이트) 1:7,500로 희석하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후, 위의 방법으로 세척하였다. BCIP/NBT 포스파타아제 기질 시스템(Phosphatase Substrate System)으로 발색시킨 후, 막을 증류수로 세척하여 발색을 중지시켰다. 1차 항체로 이용하는 알레르기 환자혈청의 경우 1/40으로 희석하여 사용하고, 2차 항체로는 염소 항-토끼 IgG-AP 콘쥬게이트를 1/100으로 희석하여 사용하였다.

[0057]

20개의 메밀 알레르기 환자의 혈청을 이용하여 메밀 단백질에 대한 웨스턴 블로팅(Western blotting)을 실시한 결과를 도 2에 나타내었다. 메밀은 24 kDa, 19 kDa, 16 kDa, 10 kDa 단백질이 항원으로 이미 알려져 있으며, 상기 항원 중 24 kDa, 19 kDa와 16 kDa의 단백질은 Fag e 1, Fag e 3 및 Fag e 2로 알레르겐으로 등재되어있다. 국내 환자를 대상으로 한 웨스턴 블로팅 결과에서는 24kDa 부위에서 12명 환자(60%)가 반응하여 가장 높은 반응을 보였으며, 19kDa에서는 7명이 반응하였고, 16 kDa에서는 5명이 반응하였다. 알레르겐으

로 알려져 있지 않은 30 kDa 이상의 단백질에서도 많은 반응이 나타났다.

[0058] **메밀 단백질의 알레르기 항원성 평가**

[0059] 항체 생산을 위해 3-3.5 Kg의 토끼(중앙실험동물, 대한민국)를 구입하여 1주일정도 사육장에서 순화를 시켰다. 순화시킨 토끼에 생리식염수에 메밀에서 분획한 3-∞ kDa의 메밀단백질을 10 mg/mL으로 희석한 용액에 FCA를 1:1의 비율로 에멀전을 제조하여 토끼 한 마리당 1 mL씩 등 부위에 두 번에 나누어 1차 피하주사를 하였다. 항원 주사는 2주에 한번씩 주입하였으며 2차 부터는 FIA를 이용하였다. 채혈은 항원 주입 1주일 후에 실시하였다. 채혈방법은 1-3주차까지는 부분 채혈법을 사용하였으며 토끼 귀의 바깥쪽 정맥혈에서 주사기로 약 2 mL을 취하였다. 마지막 4주차에서는 토끼 안구에서 채혈하였으며 각각의 토끼에서 약 70 mL씩을 취하였다. 채혈 한 혈액은 상온에서 3시간 정도 방치하여 응고시킨 뒤 튜브의 벽면에 붙은 혈구덩어리를 멸균봉으로 훑어 내었다. 그리고 하룻밤 냉장보관한 뒤 12,000 RPM에서 10분 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청은 보존료인 NaN₃(0.1%)를 첨가하여 -80℃에서 보관하였다.

[0060] 약 3.5-4kg의 토끼에서 얻어낼 수 있는 채혈량은 평균 69 mL이며 혈청의 수율은 47%이었다. 3-1과 3-2의 토끼는 3-∞ kDa 크기의 메밀 단백질을 주사한 토끼이며 1차 주입 때부터 항원가가 급격히 증가하여 3-1은 0.97, 3-2는 0.903을 보였으며 2주차에서 부터 증가량이 감소됨을 보였으나 4주차까지 1.38과 1.43까지 증가하였고 3-2혈청이 항원가가 높았다(도 3). 따라서 3-2 혈청을 사용하기로 하였다.

[0061] **효소 처리**

[0062] 메밀 단백질을 상업적으로 판매되는 알칼라아제(Alcalase), 알카라인(Alkaline), 브로멜라인(Bromelain), 칼루풀린(Callupulin), 에스페라아제(Esperase), 플라보자임(Flavourzyme), GC 106, 파파인(Papain), 프로타멕스(Protamex)의 9종 단백질 분해효소를 10 (w/w)%의 농도로 사용하여 4시간 동안 가수분해하였다.

[0063] **열 처리**

[0064] 60℃, 80℃, 100℃ 및 120℃에서 증류수에 용해시킨 5% 메밀 단백질을 가열처리하였다.

[0065] **메밀의 알레르기 항원성 저감화 정도 측정**

[0066] (1) SDS-PAGE

[0067] SDS-PAGE는 12% 세퍼레이팅 겔과 4% 스테핑 겔을 이용하였다. 시료는 2배 농도의 시료 버퍼(H₂O 3.8 mL, 0.5 M Tris-HCl(pH 6.8) 1.0 mL, glycerol 0.8 mL, 10 % SDS 1.6 mL, 1 % bromophenol blue 0.4 mL)와 1:1(w/w)로 혼합한 후 100℃에서 5분 동안 중탕하고 30 μL를 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔의 웰에 주입 후 전기영동 완충용액(0.025 M Tris-HCl, 0.192 M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)으로 200V에서 45분간 전기영동 하였다. 쿠마시브릴리언트 블루로 30분 염색 후 탈색액(에탄올:아세트산:물 = 25:8:65)으로 탈색하였다.

[0068] (2) ciELISA(간접 경합 ELISA)

[0069] 토끼 항혈청을 이용한 메밀 알레르겐의 알레르겐 저감화 정도를 측정하기 위하여 ciELISA를 실시하였다. 즉, 메밀에서 추출한 단백질을 2 /mL의 농도로 코팅 버퍼(tris hydroxymethyl aminomethane 0.05M, pH 9.0)에 희석하였다. 이를 마이크로플레이트 웰에 100 썩 각각 분주하여 4℃에서 하룻밤 정치하였다. 이것을 세척 버퍼(phosphate buffered saline with Tween 20, PBST; 0.01 M phosphate buffer with 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.05% Tween 20)로 3회 세척한 다음, 1/500로 희석한 토끼혈청을 각 웰 당 100 썩 넣고 1시간 반응시켜 경합반응을 유도한 후 다시 3회 세척하고 2차 항체로 염소 항-토끼 IgG-HRP 콘쥬게이트를 1/10,000로 희석한 용액을 100 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 다시 3회 세척한 후 기질용액(0.01% TMB in phosphate-citrate buffer pH 5.0, 0.001% H₂O₂) 100 를 첨가하여 30분 반응 후 2M H₂SO₄를 50 를 가하여 반응을 정지시키고 마이크로플레이트 리더(Emax, Molecular Devices)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0070]

(3) 간접 비경합 ELISA

[0071]

효소처리한 메밀 단백질 시료의 농도를 50 µg/ml로 맞추기 위해 0.05 M 카보네이트-비카보네이트 완충액(carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6)에 시료를 희석하였다. 단백질 시료의 코팅을 위해 이를 마이크로플레이트 웰에 100 µL씩 분주한 후 4°C에서 16시간 동안 정치하였다. 코팅된 플레이트를 0.05% PBS-Tween 20으로 3회 세척 후 2% BSA-PBS를 200 µL씩 분주하여 1시간 동안 차단(blocking)하였다. 3회 세척 후 메밀 알레르기 환자 혈청과 2% BSA-PBS를 1:80의 비율로 희석한 후 100 µL씩 분주하여 2시간 동안 반응시켰다. 3회 세척 후 염소 항-인간 IgE-HRP(Goat anti-Human IgE-HRP, 1µg/µL)와 2% BSA-PBS를 1:2,500의 비율로 희석한 후 100 µL씩 분주하여 1시간 동안 반응시켰다. 3회 세척 후 기질로써 TMB 퍼옥시다아제(peroxidase) 용액을 100 µL씩 분주하고 30분 동안 인큐베이션 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0072]

실험 결과

[0073]

효소 처리에 따른 알레르기 항원성 저감

[0074]

분해된 메밀 단백질을 SDS-PAGE 및 토끼 항체로 웨스턴 블로팅한 결과 알카라인 프로테아제를 처리한 경우 단백질 밴드 및 항원-항체 반응이 거의 확인되지 않을 정도로 단백질이 분해되고 메밀 단백질의 알레르겐 항원성이 제거되었으며, 브로멜라인(16 kDa 및 24 kDa에 작용), 프로타멕스(16 kDa, 19 kDa 및 24 kDa에 작용), 칼루폴린(19 kDa 및 24 kDa에 작용) 또는 파파인(16 kDa, 19 kDa 및 24 kDa에 작용)을 처리한 경우 일부의 단백질 밴드 및 항원-항체 반응이 감소된 반면, 플라보자임, 에스퍼라아제 및 GC106를 처리한 경우 대부분의 단백질이 분해되지 않고 이의 항원성도 그대로 유지됨을 확인할 수 있었다(도 4 및 도 5).

[0076]

알칼라아제, 알카라인 프로테아제, 브로멜라인, 파파인을 메밀 단백질에 처리한 경우 약 10²배 항원성이 저감되었고, 칼루폴린 및 프로타멕스의 경우 약 40배 항원성이 저감되었으나 다른 효소들에서는 항원성 저감효과가 나타나지 않았다(표 2 및 도 6).

표 2

효소	IC ₅₀ (ug/mL)	항원성 감소(배)
대조군	1	1
알칼라아제	100	100
알카라인	100	100
브로멜라인	100	100
칼루폴린	39.8	39.8
에스퍼라아제	0.5	0.5
플라보자임	0.5	0.5
GC 106	1.25	1.25
파파인	100	100
프로타멕스	39.8	39.8

[0077]

[0078]

열 처리에 따른 알레르기 항원성 저감

[0079]

증류수에 용해시킨 5% 메밀 단백질을 60°C, 80°C, 100°C 및 120°C에서 1시간 동안 가열한 후 단백질 분해도를 SDS-PAGE, 토끼 항체를 이용한 웨스턴 블로팅 및 ciELISA를 통해 확인하였다. SDS-PAGE상에서는 100°C 이상에서 메밀의 주요 알레르겐 단백질 밴드(10 kDa, 16 kDa, 19 kDa, 24 kDa 및 30-50 kDa)가 사라진 것을 확인할 수 있었으나 250 kDa 부위에 거대 단백질이 확인되었다(도 7). 토끼 항원을 사용한 웨스턴블로팅 상에서도

SDS-PAGE 결과와 같은 양상의 결과를 확인할 수 있었다(도 8).

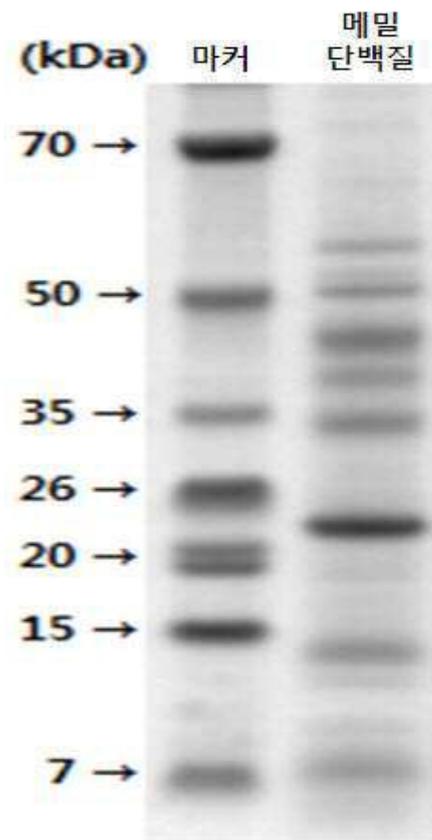
[0080] 열처리에 따른 메밀 단백질의 알레르기성 변화를 정확히 측정하기 위하여 ciELISA로 측정한 결과 60℃ 및 80℃ 가열처리의 경우 항원성 저감효과가 없었으나 100℃의 경우 약 10³배 이상의 항원성 저감효과가 있었고, 120℃로 가열한 경우 약 10⁴배의 효과가 있는 것으로 나타났다(도 9 및 도 10).

[0081] 따라서 100℃와 120℃에서 시간별로 열처리를 실시하였다(도 11). 그 결과 두 온도 모두 가열시간이 증가함에 따라 16 kDa의 단백질이 감소하는 경향을 나타냈다(도 12). 간접경합ELISA 결과에서는 100℃에서 10분 이상 가열처리의 경우 항원성 저감효과가 10⁰⁰배인 것으로 나타났다(도 13a 및 도 14a). 120℃ 시료에서는 가열처리 시간 10분 이상에서 10⁰⁰배의 효과가 있는 것으로 나타났다(도 13b 및 도 14b).

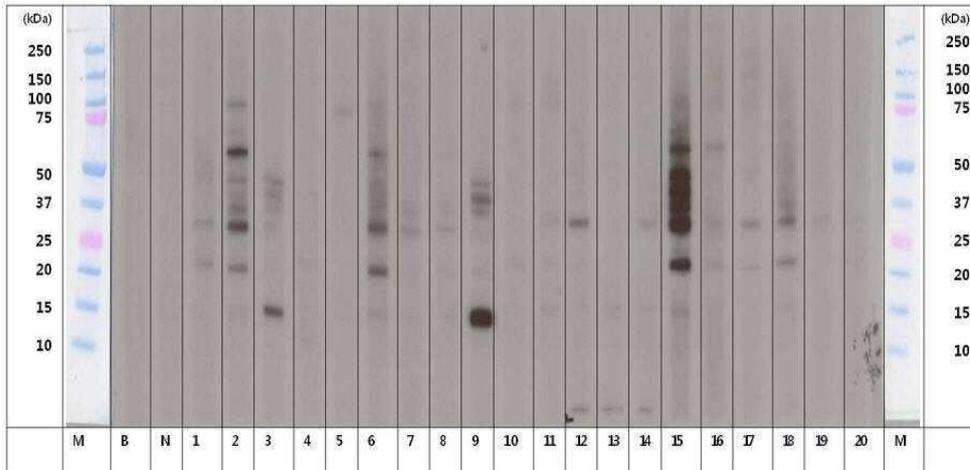
[0082] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

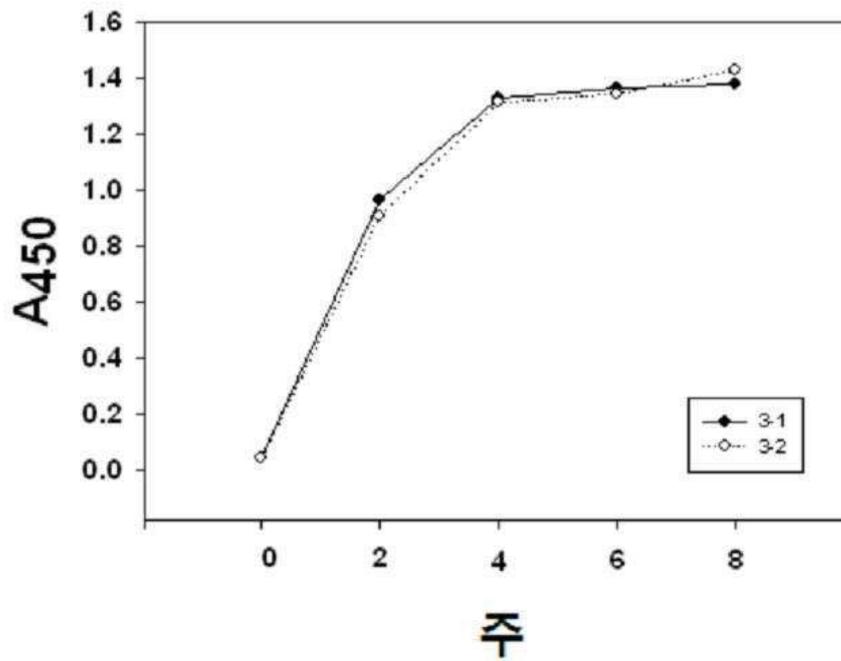
도면1



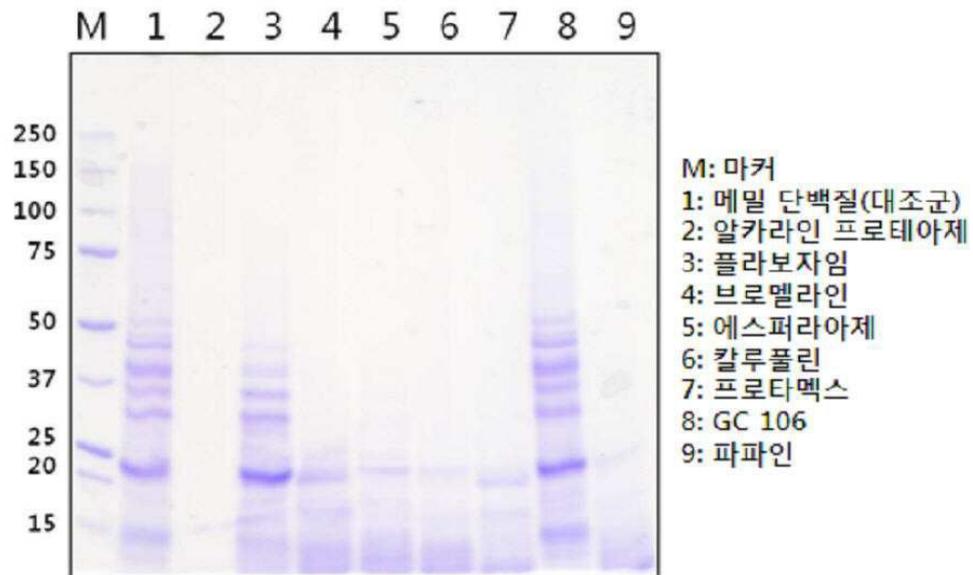
도면2



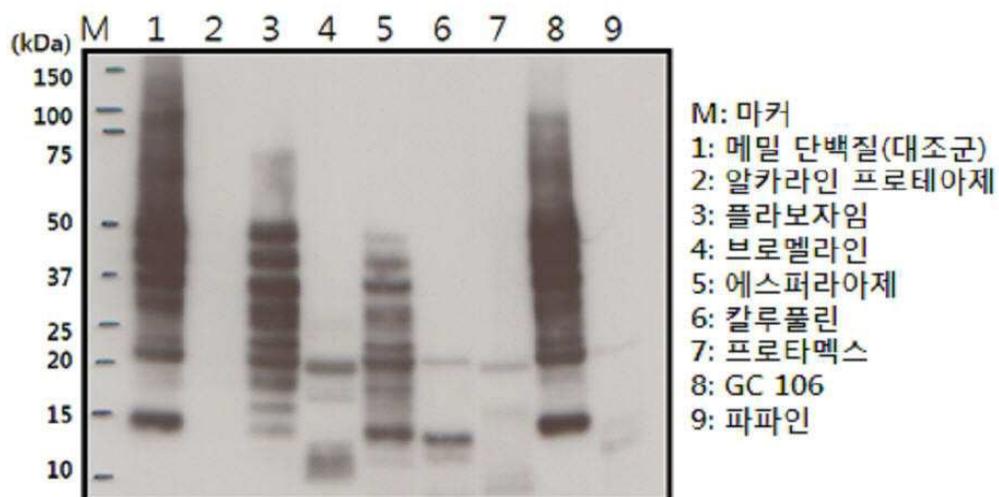
도면3



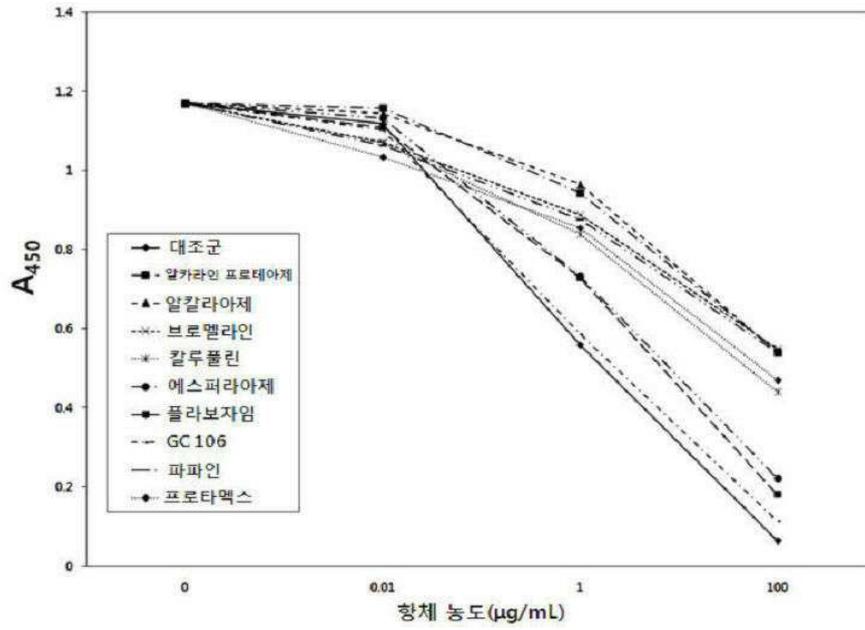
도면4



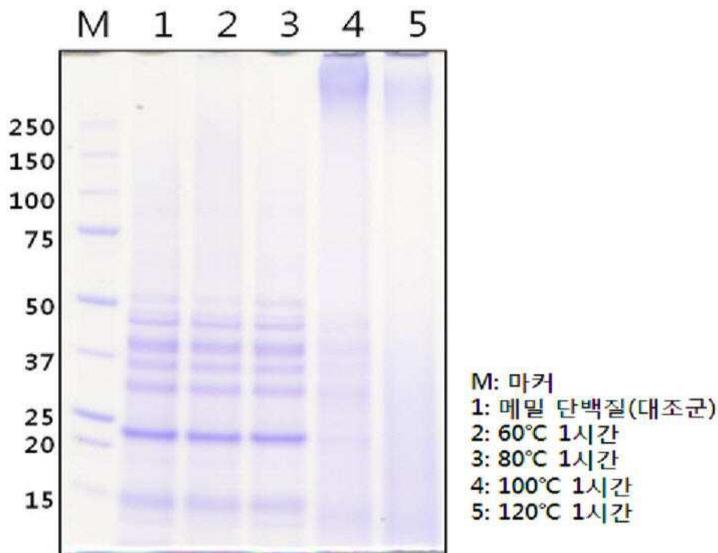
도면5



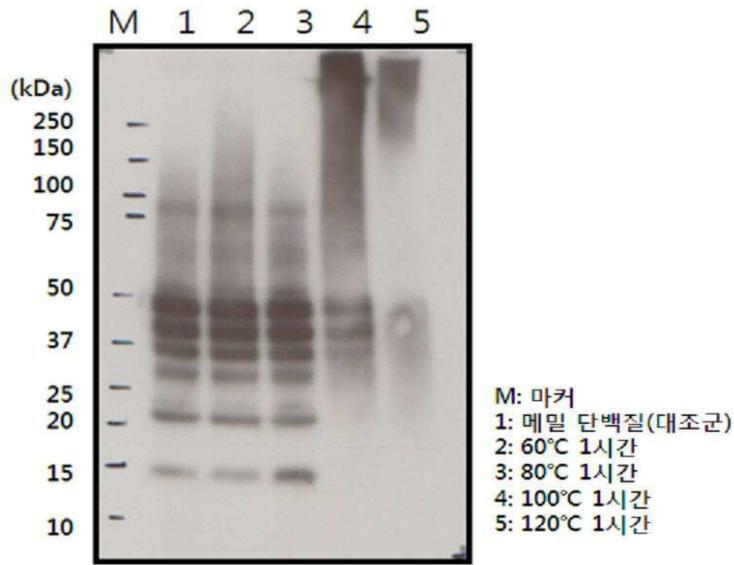
도면6



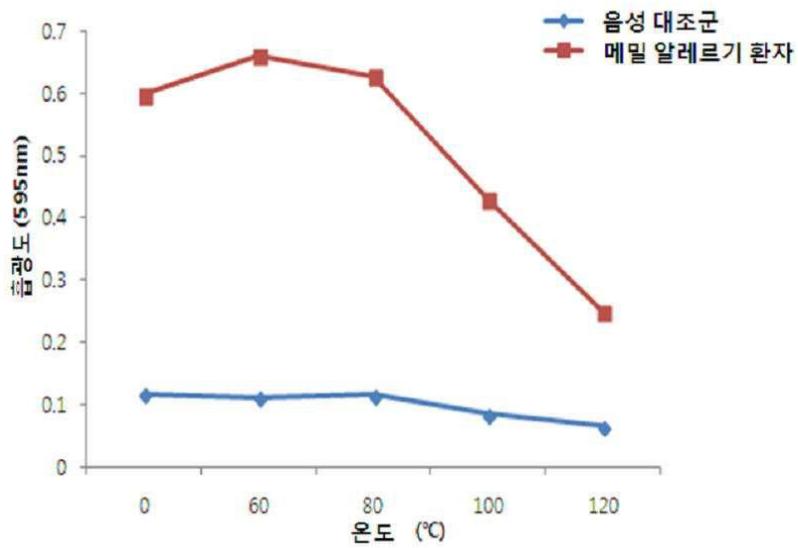
도면7



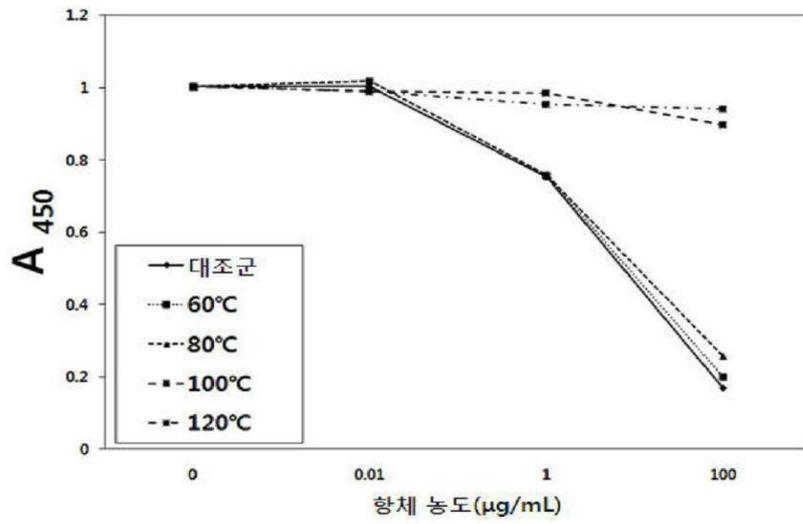
도면8



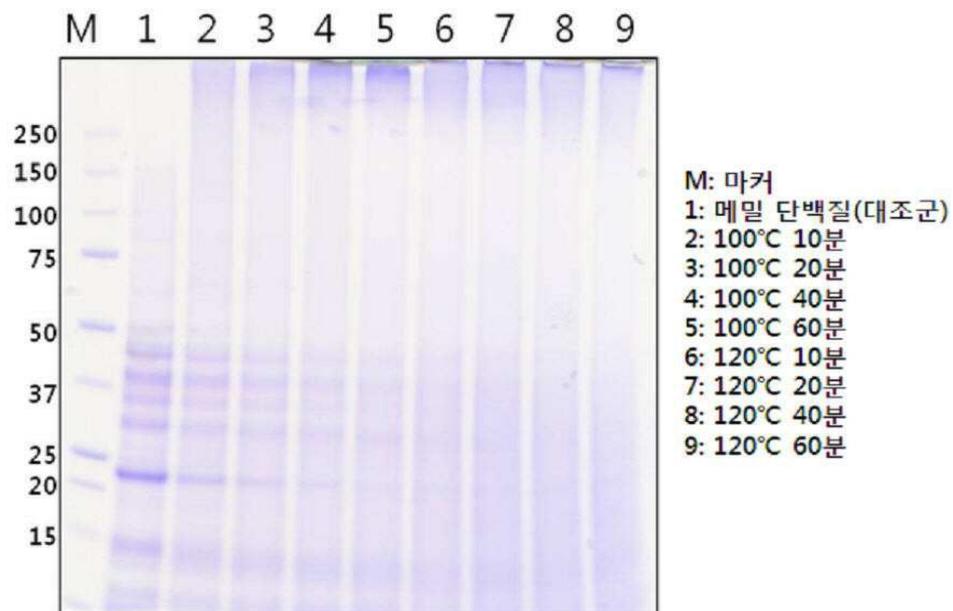
도면9



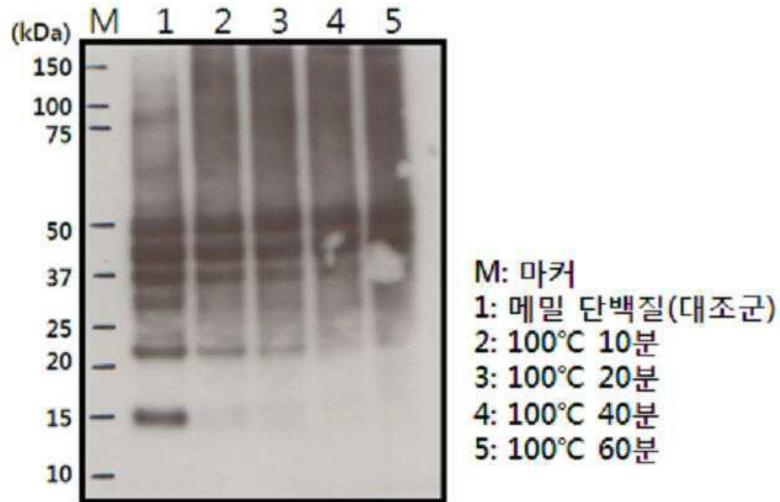
도면10



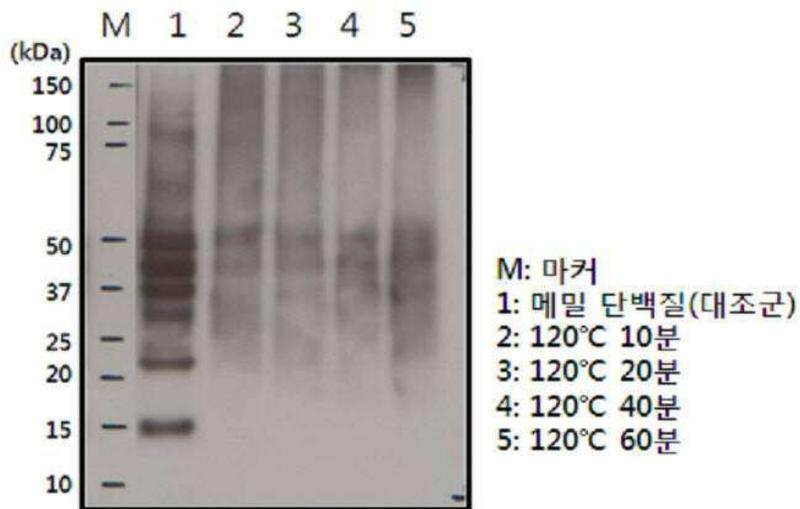
도면11



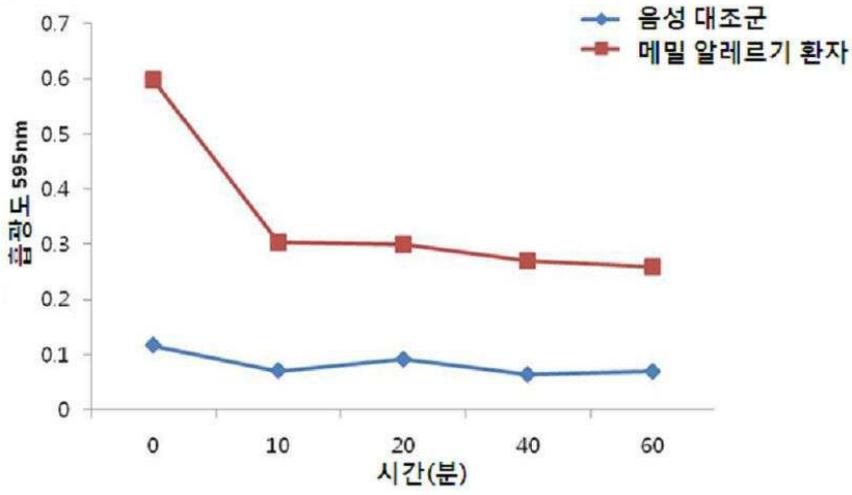
도면12a



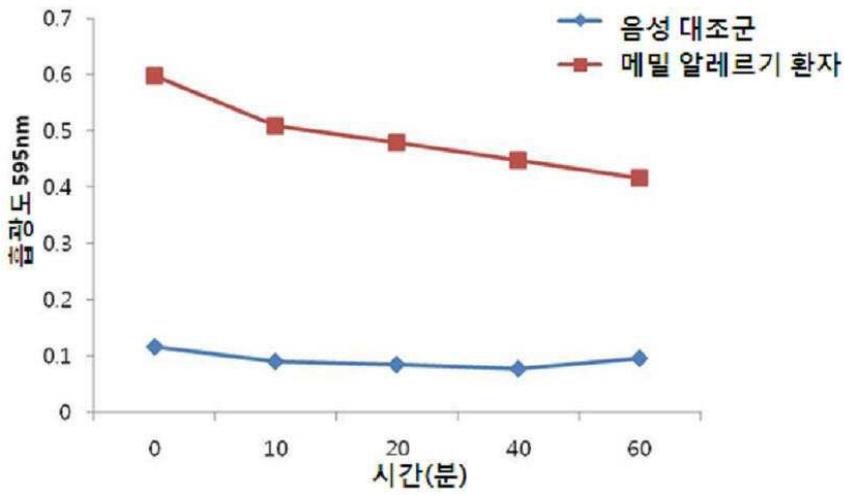
도면12b



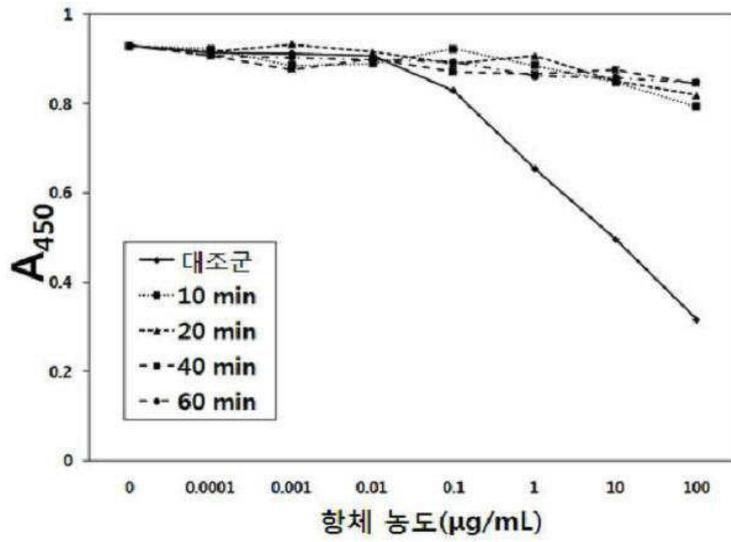
도면13a



도면13b



도면14a



도면14b

